

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
7 février 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/10173 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07D 487/22, A61K 31/409, A61P 35/00, A61K 49/00
// (C07D 487/22, 257:00, 20:00, 209:00, 209:00, 209:00)

(74) Mandataire : DAWIDOWICZ, Armand; Cabinet Dawidowicz, 18, boulevard Pereire, F-75017 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/02470

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international : 27 juillet 2001 (27.07.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/10165 1 août 2000 (01.08.2000) FR

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
ANULM ASSOCIATION NATAISE POUR L'UTILISATION DE LA LUMIERE EN MEDECINE [FR/FR];
Département Laser, Hôpital Laennec, F-44093 Nantes
Cedex 01 (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

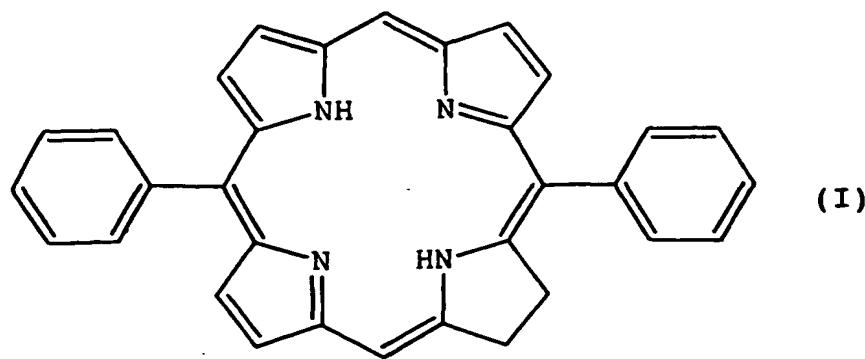
(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BOURRE, Ludovic [FR/FR]; 2, chemin Clos du Moulin, F-44470 Nantes sur Loire (FR). PATRICE, Thierry [FR/FR]; 12, allée des Lys, F-44800 Saint Herblain (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: DIHYDROPORPHYRIN DERIVATIVES AND THEIR USES

(54) Titre : DERIVES DE DIHYDROPORPHYRINE ET LEURS APPLICATIONS



WO 02/10173 A1

(57) Abstract: The invention concerns a compound derived from dihydroporphyrin corresponding to the general formula (I), wherein: the phenyl groups are substituted or not; or one of its salts, or one of its metal complexes. The invention is applicable to treatment by photochemotherapy.

(57) Abrégé : L'invention concerne un composé dérivé de dihydroporphyrine répondant à la formule générale (I): dans laquelle les groupes phényles sont substitués ou non; ou l'un de ses sels, ou l'un de ses complexes métalliques.

15 dérivés de dihydroporphyrine et leurs applications

L'invention concerne de nouveaux composés dérivés de dihydroporphyrine et leurs applications, notamment dans les 20 domaines de la photochimiothérapie, en particulier pour le traitement de cancer, de l'imagerie par fluorescence et de l'optoélectronique.

Les porphyrines et leurs dérivés ont fait l'objet de 25 nombreuses études ces dernières années en raison de leur large domaine d'application potentiel. Ainsi, les brevets US-5.162.519, US-4.992.257, US-4.837.221, US-5.162.519 et US-5.703.230 illustrent de tels exemples de composés.

30 Parmi ces nombreux domaines d'application, la photochimiothérapie est apparue aujourd'hui comme l'un des domaines les plus prometteurs. La photochimiothérapie est une technique de traitement qui s'est développée il y a quelques années, en particulier pour le traitement de 35 cancers. Cette technique comprend l'administration d'un agent photosensible, à priori peu毒ique, qui va être retenu avec une sélectivité relative par les tissus à index mitotique élevé, en particulier le tissu néoplasique. Cet

2

agent photosensible est alors excité par une radiation lumineuse de longueur d'onde adaptée au spectre d'absorption lumineuse du photosensibilisant. Les radiations lumineuses absorbées par la molécule 5 photosensible entraînent des réactions de type 1 (production de radicaux hydroxyles) ou de type 2 (production d'oxygène singulet) par un mécanisme de conversion intersystème. Ces espèces radicalaires entraînent des réactions d'oxydation et de peroxydation au 10 niveau des tissus qui ont fixé le photosensibilisant et par suite la mort cellulaire.

L'efficacité de la technique repose sur des propriétés déterminées de l'agent photosensible. Ainsi, pour provoquer 15 l'effet phototoxique désiré en profondeur à l'intérieur d'un tissu d'un sujet, il est nécessaire d'utiliser des photosensibilisants qui possèdent des coefficients d'absorption élevés à des longueurs d'onde supérieures à 650 nm, là où les tissus corporels sont les plus 20 transparents à la lumière (voir Sternberg et al. "An Overview of Second Generation Drugs for Photodynamic Therapy including BPD-MA (Benzoporphyrin Derivative) Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers, 470-4 (Spinelli et al. eds. 1992).

25

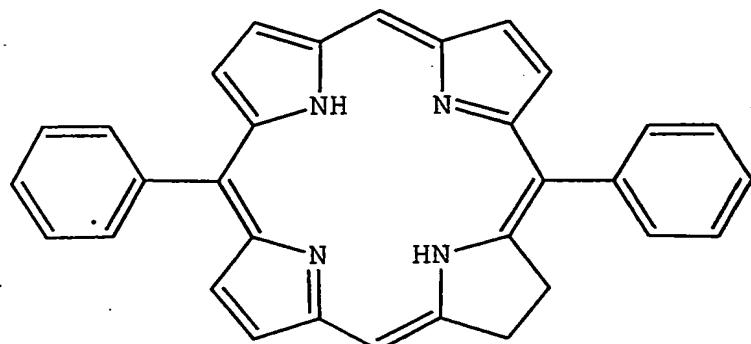
De même, l'agent photosensible doit d'une part présenter une vitesse de pénétration rapide dans les cellules cibles à détruire de manière à réduire le temps nécessaire entre l'administration de l'agent photosensible et les radiations 30 lumineuses, d'autre part un temps de rétention court dans les zones saines pour réduire les effets secondaires et le temps d'hospitalisation ainsi que les risques de brûlures iatrogènes lors d'exposition intempestive à la lumière. On est donc constamment à la recherche de nouvelles molécules 35 photosensibles présentant un temps de rétention plus court dans les zones cibles de l'organisme d'un être vivant, cette durée de vie plus courte pouvant présenter un intérêt dans les autres domaines d'application, en particulier

l'imagerie médicale et l'optoélectronique.

C'est pour satisfaire à ces exigences de captation rapide par le tissus cible et d'élimination rapide par les autres 5 tissus, en comparaison des composés existants que la molécule objet de l'invention a été synthétisée.

A cet effet, l'invention a pour objet un nouveau composé de dihydroporphyrine répondant à la formule générale (I) :

10

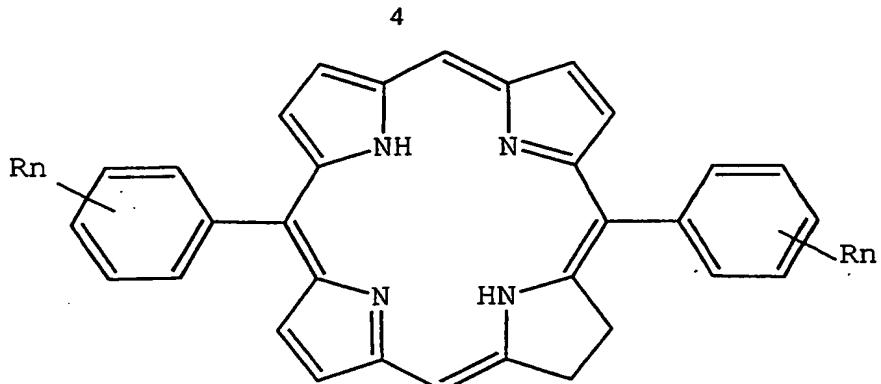


dans laquelle les groupes phényles sont substitués ou non ; ou l'un de ses sels, ou l'un de ses complexes métalliques.

15

Les composés de l'invention peuvent exister comme mentionné ci-dessus à l'état de sel d'addition à centre acide ou basique ou à l'état de complexe métallique.

20 L'invention a encore pour objet un composé dérivé de dihydroporphyrine du type précité répondant à la formule générale (II) :



15 dans laquelle le groupe phényle est substitué, n est égale de 1 à 5, de préférence égale de 1 à 3, et chaque substituant R, qui peut être identique ou différent, et 5 dans des positions identiques ou différentes sur son groupe phényle substitué est un groupe hydroxy (-OH), amine (-NH₂), sulphydryle (-SH), phosphonate (PO₃H₂, PO₃Na₂), éthylphosphonate (PO₃Et₂), sulfonate, aromatique, alkyl substitué ou non, cycloalkyl substitué ou non, aliphatique, 10 acide aminé, peptide ou polypeptide, pyridine avec différentes positions pour l'atome d'azote, purine, pyrimidine, nucléoside, saccharide, polysaccharide, acide carboxylique, un groupement amide, un groupement ester, un ammonium quaternaire substitué ou non.

15

Par groupe aliphatique ci-dessus, on entend en particulier un ou plusieurs acides aminés ne comprenant pas de cycle, à savoir, par exemple, la serine ou une chaîne polyéthylène glycol (PEG) ou tout autre substituant.

20

Par groupe aromatique mentionné ci-dessus, on entend en particulier un ou plusieurs acides aminés comprenant au moins un cycle aromatique par exemple Phe ou Tyr ou tout autre groupement aromatique carboné ou non.

25

A nouveau, les composés décrits ci-dessus peuvent être sous la forme de dérivés tels que des sels, d'addition à centre acide ou basique, des complexes métalliques, par exemple Zn, Ga, Pa, ou des hydrates ou d'autres solvates, en

particulier avec des alcools aliphatiques inférieurs en C₁-C₆.

L'invention sera bien comprise à la lecture de la 5 description suivante d'exemples de réalisation, en référence aux dessins annexés dans lesquels :

la figure 1 représente la toxicité et la phototoxicité de cellules SIM01 sur des cellules C6 laissées à 10 incuber pendant 5 heures ;

la figure 2 représente la toxicité et la phototoxicité de cellules SIM01 sur des cellules C6 laissées à 15 incuber pendant 20 heures ;

la figure 3 représente, sous forme de courbes, l'intensité de fluorescence intracellulaire des molécules SIM01 et m-THPC ;

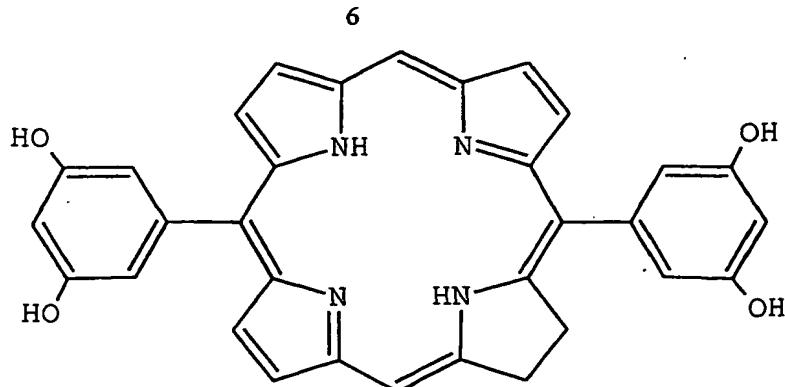
la figure 4 représente, sous forme de courbes, la 20 croissance d'une tumeur mesurée à différents intervalles de temps après injection de SIM01 ;

la figure 5 représente des courbes analogues à la 25 figure 4 après injection de SIM01 ou de m-THPC et

la figure 6 représente des courbes de mesure 30 spectrofluorimétriques sur différents tissus de souris greffées à différents intervalles de temps après injection de m-THPC ou SIM01.

L'exemple qui suit illustre la préparation d'un composé préféré de l'invention.

35 La synthèse de ce composé, répondant à la formule générale (III),



et qui sera appelé par la suite pour simplifier SIM01 comporte les étapes suivantes.

5

Etape 1 : dipyrrylméthane

Du dipyrrylméthane a été préparé comme précédemment mentionné dans Wang et Bruce, *Synlett*, 1267, 1995.

10 **Etape 2 : 5,15-Bis(3,5-diméthoxy-1-phényl)porphyrine**

Du di-méthoxy-3,5-benzaldéhyde (341 mg, 2,05 mmole), du dipyrrylméthane (300 mg, 2,05 mmole) ont été ajoutés dans 205 ml de dichlorométhane distillé dans un flacon à fond circulaire. La solution a été soumise aux ultrasons dans un flux d'azote pendant 20 minutes. Ensuite, de l'acide trifluoroacétique (47 ml, 615 mmole) a été injecté et le mélange a été agité à température ambiante toute la nuit.

20 Une solution de DDQ 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (0,931 g dans 10 ml de toluène) a été ajoutée et le mélange de réaction a été mis sous reflux pendant 30 minutes avec un bain d'huile préchauffé à 60°C.

25 La purification de la porphyrine a été accomplie par chromatographie flash éluée avec de l'hexane/CH₂Cl₂ : 5/5 et a fourni 253 mg de la porphyrine désirée (36 %).

30 RMN 1H (CF₃COOD) ppm : 11:13 (H meso), 9,7 et 9,3 (2H, d, J = 6Hz, pyrrole), 7,9 (o-H, phényl), 7,4 (p-phényl), 4,2 (méthoxy)

UV-Vis (CH₂Cl₂), max (nm) : 407, 502, 536, 574, 629.

FAB-MS : calculé pour C₃₆H₃₀N₄O₄ : 582,2 trouvé : 583
5 (M+H⁺).

Etape 3 : 5,15-Bis(3,5-dihydroxy-1-phényl)porphyrine

Le composé de l'étape 2 (90 mg, 0,15 mmole) a été dissous dans du CH₂Cl₂ sec (10 cm³) à -20°C, suivi par l'addition de 10 BBr₃ (0,12 cm³, 1,24 mmole). La solution verte résultante a été agitée pendant 12 heures puis placée dans de l'eau glacée. Du méthanol (20 cm³) et ensuite de l'acétate d'éthyle (10 cm³) ont été ajoutés à la suspension et le mélange a été neutralisé avec du NaHCO₃. La couche 15 organique a été séparée, lavée d'abord avec une solution de NH₄Cl puis deux fois avec de l'eau et séchée sur du sulfate de sodium anhydre. La solution résultante a été évaporée sur un évaporateur rotatif et le résidu redissous dans de l'acétone. Après addition de pentane, une précipitation a 20 fourni le composé de l'étape 3 avec un rendement de 52 %.

RMN 1H (acétone d6) : 10.55 (H meso), 9,6 et 9,3 (2H, d, J = 6Hz, pyrrole), 7,3 (o-H, phényl), 6,9 (p-phényl), -3,1 (NH).

25

UV-Vis (acétone), max (nm) : 402, 532, 572, 628.

Etape 4 : 2,3-dihydro-5,15-Bis(3,5-dihydroxy-1-phényl)-prophyrine (SIM01)

30

Le composé de l'étape 3 (42 mg, 0,08 mmole), du K₂CO₃ anhydre (0,32 g) et de la pyridine anhydre (5 cm³) ont été chauffés (120°C) pendant 5 minutes. Ensuite, de faibles quantités (0,25 cm³) d'un mélange de p-toluenesulfonylhydrazide (0,44 g) dans de la pyridine (2,5 cm³) ont été ajoutés toutes les 15 mn pendant 2,5 heures. Après refroidissement, la solution de pyridine a été

évaporée sous vide. La poudre résultante a été redissoute dans un mélange 1/1 d'acétone/acétate d'éthyle, puis lavée deux fois avec de l'eau et ensuite saturée avec une solution de bicarbonate. De l'o-chloranil a été ajouté en 5 portions à la solution organique à température ambiante jusqu'à ce que le pic d'absorption à 735 nm ait disparu. La solution a été lavée deux fois avec NaHSO_4 (5 %), de l'eau distillée, NaOH (0,1 M) et du bicarbonate saturé. Après séchage sur MgSO_4 , le solvant a été évaporé sur un 10 évaporateur rotatif. Le résidu a été cristallisé à partir d'acétone/pentane pour fournir 31 mg du composé de l'étape 4 (rendement 74 %) qui sera appelé ci-après SIM01.

15 RMN ^1H (acétone, d6) ppm : 10,1 et 9,2 (2H-meso), 9,35-8,6 (6H, m, pyrrole), 7,2 et 6,95 (4H, d, o-phényl), 6,85 et 6,75 (2H, t, p-phényl), 4,65 et 4,45 (4H, m, pyrrolidine), -1,4 et -1,9 (2H, s, NH).

20 UV-Vis (acétone), max (nm) : 395, 405, 500, 645.

La méthode de préparation de ces composés est différente de celle utilisé pour m-THPC (Brevet US 5,162,519). Elle implique une réaction entre un aldéhyde aromatique et du dipyrrylméthane ce qui aboutit à la première étape de la 25 synthèse de SIM01 alors que m-THPC implique la réaction de pyrrole et d'aldéhydes aromatiques.

Les composés de l'invention ont fait l'objet d'essais qui ont mis en évidence leurs propriétés thérapeutiques.

30 A cet effet, les composés de l'invention peuvent être présentés sous forme de médicaments caractérisés en ce qu'ils consistent en un des composés précités ou sous forme de composition pharmaceutique contenant un composé du type 35 précité associé à un excipient.

Les composés de l'invention peuvent être présentés sous toute forme de composition administrable au corps humain ou

animal et appropriée à l'administration entérale, parentérale ou transdermique, tel que comprimé, dragée, crème dermique, gélule, capsule, suspension ou solution buvable ou injectable, tel que sirop ou ampoule, timbre 5 transdermique, formulation liposomale (nanoparticules) etc. associés à des excipients convenables et dosés pour permettre une ou plusieurs cures comprenant une ou plusieurs administrations journalières pendant un jour ou plusieurs jours à raison d'une dose comprise par exemple 10 entre 0,1 et 20 mg/kg de poids.

Les formes administrables préférées sont les formes injectables, en particulier sous forme d'une injection intramusculaire ou intraveineuse ou sous forme 15 d'application transcutanée.

Les essais décrits ci-dessous portent sur l'activité de la molécule SIM01. L'activité de cette nouvelle molécule SIM01 a été testée *in vitro* avec des essais de toxicité et de 20 phototoxicité et *in vivo* par une étude de phototoxicité par évaluation des retards de croissance de tumeurs par rapport à des animaux non traités.

La pharmaco cinétique de SIM01 a également été étudiée pour 25 déterminer le retard pour une incorporation maximale de SIM01 comparé au retard d'incorporation de la m-THPC (molécule classique largement utilisée dans le domaine de la photo-chimiothérapie). L'analyse de l'élimination de SIM01 par rapport à m-THPC a aussi été étudiée.

30 La SIM01 est un dérivé de porphyrine de poids moléculaire 524. La SIM01 montre, dans une solution isotonique saline, 3 spectres principaux d'absorption à 428, 513 et 652 nm. La solution saline a été obtenue comme suit : un milligramme 35 de SIM01 a été dissous dans 1 ml de solvant (50 % d'eau, 30 % de PEG et 20 % d'éthanol pur à 99 %). D'autres concentrations ont été obtenues successivement par addition d'une solution isotonique saline.

Pour étudier la toxicité et la phototoxicité de la molécule SIM01, il a été procédé comme suit :

5 Des cellules C6 ont été mises en culture dans des flacons falcon de 25 cm² (Polylabo, Strasbourg, France) dans un milieu RPMI supplémenté avec 10 % (V/V) de sérum de veau foetal (FCS), 100 unités de pénicilline mL⁻¹, 100 mg de streptomycine et 2 mM de glutamine.

10

Les cellules ont été repiquées en culture par dispersion avec 0,025 % de trypsine dans 0,02 % d'acide éthylène-diaminetétraacétique (EDTA) pendant un temps de contact de 2 minutes et remises à adhérer suivant une dilution 1:3, ce 15 qui a maintenu les cellules dans la phase exponentielle de croissance. Les cellules ont été vérifiées sur une base régulière par contamination des mycoplasmes.

20 Les cellules ainsi cultivées ont été soumises à un traitement photodynamique. Des aliquotes (11 µl) de la solution photosensibilisante SIM01 ont été ajoutées à des cellules C6 adhérées dans des puits de plaques à 96 puits après trypsination comme décrit ci-dessus. La concentration cellulaire était de 5.10⁴ cellules/ml⁻¹ (100 µl par puits).

25 La concentration finale des solutions de SIM01 était comprise dans la plage de 0,5 à 50 µg/ml. Immédiatement après addition du photosensibilisant SIM01, les plaques de cellules ont été maintenues dans une obscurité complète jusqu'au temps de comptage à l'exception d'une irradiation

30 laser des cellules traitées au PDT. Des milieux frais contenant du FCS mais exempt de photosensibilisant ont été préparés avant irradiation laser. Un laser à diode à 650 nm a été utilisé. La puissance à l'extrémité de la fibre a été réglée, en utilisant un dispositif de mesure de puissance (Coherent, France), à 500 mW. La lumière a été transmise à la cible par une fibre optique à une distance de 20 mm afin d'irradier des cellules dans un puits de 6 mm de diamètre à l'intérieur d'un champ unique fournissant une illumination

11

de la totalité de la zone. Le temps d'exposition a été de 13 secondes par puits à 650 nm fournissant une densité d'énergie de 20 J/cm².

5 Les cellules ont été incubées avec SIMO1 pendant 5 ou 20 heures. Pour les essais de phototoxicité, les cellules ont été lavées et le milieu a été remplacé immédiatement avant irradiation laser.

10 Les comptages de cellules ont été réalisés 24 heures après la fin des expériences afin d'éviter des sous-estimations des cellules survivantes en écartant des cellules altérées mais vivantes. Au moment du comptage, 15 µl de solution saline tampon au phosphate (solution PBS-MTT, 5 mg/ml⁻¹)

15 ont été ajoutés aux puits. Après 4 heures, 150 µl d'isopropanol-HCl 0,04N ont été ajoutés conformément à la méthode décrite par Mosmann (T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immunol. Methods, 20 65, 55-63, 1985).

La densité optique de chaque puits des microplaques ont ensuite été lues à 570 nm au moyen d'un Uniskan Titerteck (Flow Laboratories, Puteaux, France). Un appareil contenant 25 du RPMI sans rouge de phénol et avec 15 µl d'une solution MTT a été utilisé pour déterminer les blancs pour les mesures d'absorbance.

Les résultats sont fournis aux figures 1 et 2 dans 30 lesquelles la figure 1 représente la toxicité et la phototoxicité de SIMO1 sur des cellules C6 laissées à incuber pendant 5 heures avec SIMO1 non irradiées ou irradiées avec un laser à diode à 652 nm à 20 joules/cm² puis traitées au MTT.

35

La figure 2 se distingue de la figure 1 par le temps d'incubation des cellules C6 avec SIMO1 fixé à 20 heures.

12

Au travers de ces figures, la molécule SIM01 montre une activité importante *in vitro* avec une bonne efficacité à de faibles concentrations. Pour le traitement phototoxique (20 joules/cm²), après un temps d'incubation de 5 heures, la 5 DL₅₀ était de 1,75 µg/ml et après 20 heures d'incubation de 0,45 µg/ml. Concernant la toxicité de SIM01, aucune toxicité n'a été détectée après 5 heures d'incubation et après 20 heures d'incubation, la DL₅₀ était de 29 µg/ml. Ces tests montrent clairement l'innocuité de SIM01 en 10 l'absence d'irradiation lumineuse en deçà d'une concentration proche de 20 µg/ml et, à l'inverse, sa phototoxicité certaine dès irradiation.

Afin de confirmer l'utilisation potentielle des composés 15 précités pour la fabrication d'une composition photosensible administrable à un être vivant et utile comme agent apte à engendrer, sous l'effet d'une irradiation, une cytolysé ou une nécrose au moins partielle d'au moins une zone cible du corps humain ou animal, il a été procédé à 20 une visualisation de la localisation *in vitro* de la molécule SIM01, ainsi qu'à la détermination de la pharmacocinétique comparée à m-THPC, par imagerie de fluorescence afin de confirmer que les composés précités étaient aptes à pénétrer dans les cellules. Ainsi, des 25 cellules C6 ont été ensemencées à 10⁵ cellules/ml sur des lames de verre circulaire après trypsinisation. Après 24 heures, des cellules ont été incubées avec SIM01 (10 µg/ml) à 37°C pendant 3 heures et ensuite lavées dans du PBS (pH 7,2). L'analyse de la fluorescence de SIM01 (émettant à 650 30 nm) a été réalisée après excitation de 450 nm à 480 nm par une lampe Xénon 150 W en utilisant une caméra vidéo noir et blanc à détection de photons très sensible (Kappa CF 8/4; Fischer Scientific S. A., France) reliée à un microscope optique (Olympus BX 40, France) équipé avec un objectif à 35 immersion d'huile grossissant 100 fois.

L'intensité de fluorescence la plus forte a été localisée principalement dans le cytoplasme des cellules C6. Les

13

images produites immédiatement après incubation pendant 3 heures avec SIM01 démontrent clairement que les composés sont aptes à pénétrer dans les cellules.

5 Concernant la pharmacocinétique (Figure 3), la concentration maximale de SIM01 a été observée 3 heures après incubation, avec une forte incorporation dès une heure, puis un diminution de l'intensité de fluorescence a été observée de 3 heures à 6 heures. Pour m-THPC, la 10 fluorescence intracellulaire augmente jusqu'à 6 heures, avec une faible incorporation de photosensibilisant 1 heure après incubation. L'incorporation ainsi que l'élimination plus rapide de SIM01 est due au caractère plus hydrophiles de la molécule, celle-ci ne possédant que deux phényles 15 autour du noyau tétrapyrrolique central comparé à m-THPC qui en possède quatre.

Les tests in vitro ont été suivis d'essais toxiques et phototoxiques in vivo afin de démontrer l'intérêt des 20 composés précités notamment sous forme de composition utile à des fins de diagnostic ou de traitement en démontrant que ces compositions, qui comprennent au moins un agent photosensible, sont aptes à induire in vivo lorsqu'elles sont soumises à une irradiation lumineuse et à une longueur 25 d'onde déterminée une nécrose ou une cytolysé au moins partielle d'au moins une zone cible du corps humain ou animal, cette nécrose ou cytolysé étant mesurée notamment en terme de retard de croissance d'une tumeur par rapport à une tumeur témoin. Ces essais ont permis de déterminer 30 d'une part la période de temps optimale devant être laissée entre l'injection et l'irradiation au laser, d'autre part l'efficacité de la molécule SIM01 par comparaison avec des molécules connues, en particulier le m-THPC qui est un agent photosensible dérivé d'une chlorine.

35

Pour permettre ces conclusions, il a été procédé tel que suit : des souris Nude/Nude suisses mâles âgées de 7 à 9 semaines (plage de poids 25-35 g) ont été obtenues à partir

de Iffa-Credo (L'arbresle, France).

La méthode de test est celle de la tumeur cellulaire HT29 obtenue initialement à partir d'adénocarcinome colorectal 5 humain.

Des greffons de tumeur ont été obtenus comme suit : des tissus non nécrosés de tumeurs solides (diamètre 1 à 2 cm) ont été enlevés immédiatement après mort de la souris 10 donneuse et ensuite mécaniquement broyés dans 1 ml d'une solution saline à 0,9 %. Cette solution (0,2 ml) a été injectée de manière sous-cutanée dans la patte arrière de chaque souris. Cette tumeur a été utilisée une semaine plus tard, quand son diamètre était de 18-20 mm. SIMO1 a été 15 injecté intrapérinéalement dans une solution saline et 12 heures plus tard la souris a été anesthésiée et la tumeur exposée à une lumière de 300 J/cm^2 . La longueur d'onde pour l'éclairage a été choisie entre 652-653 nm.

20 La source lumineuse était un laser à diode à 652 nm.

La densité lumineuse a été maintenue au-dessous de 0,3 W.cm^{-2} , à des doses où les effets thermiques sont indétectables. Une irradiation unique a été réalisée et le 25 temps d'exposition a été calculé en tant que fonction du diamètre de la tumeur pour obtenir une densité d'énergie de 300 J/cm^2 à une densité lumineuse déterminée constante.

Chaque jour, l'indice de croissance de tumeur a été mesuré 30 en utilisant un pied à coulisse, les diamètres orthogonaux principaux étant ajoutés et divisés par un facteur de 2.

Une comparaison statistique de l'indice de croissance entre les souris traitées et les souris de contrôle (sans lumière 35 ou SIMO1) a été faite en utilisant le test de Student.

Toutes les conditions de traitement testées comprenant l'agent photosensible et la lumière ont induit une

15

réduction de la croissance de la tumeur comparé au groupe de contrôle non traité. Les effets les plus marquants ont été observés pour un traitement incluant un retard de 12 heures entre une injection intrapéritonéale et une 5 irradiation laser. 12 jours après le traitement, la croissance de la tumeur avait ralenti de 40 %. Ces résultats sont illustrés à la figure 4 dans laquelle la croissance d'une tumeur induite par HT-29 est mesurée après irradiation à 300 J/cm^2 avec un laser à diode 652 nm 2 10 heures, 6 heures, 12 heures, 24 heures et 48 heures après injection intrapéritonéale de 5 mg/kg de SIMO1. Un groupe de contrôle n'ayant reçu aucune exposition à la lumière ou aucun agent photosensible a été constitué.

15 La figure 5 illustre les mêmes expériences que la figure 4 réalisées pour des groupes de souris traitées soit avec SIMO1, soit avec m-THPC et soumises à une irradiation 6 heures et 12 heures après injection intrapéritonéale de 2 20 mg/kg de SIMO1 ou de m-THPC. On note une activité comparable entre les deux molécules.

De nouveaux tests ont été effectués pour déterminer la période à laquelle on note une incorporation maximale des composés dans les tissus en fonction de la nature des 25 tissus et le temps de rétention du composé par lesdits tissus. Ces essais ont été faits de manière comparative entre la molécule SIMO1 et la molécule m-THPC.

Pour ces essais, il a été procédé comme suit : des mesures 30 spectrofluorimétriques ont été réalisées sur des souris greffées avec HT-29 à différents intervalles de temps après injection de 2 mg/kg⁻¹ de m-THPC ou SIMO1. Les temps testés ont été de 3, 6, 12, 24, 48 et 144 heures sur des souris. Les résultats sont fournis en figure 6.

35

Les niveaux de fluorescence ont été enregistrés dans différents tissus, à savoir le muscle, la peau et la tumeur. Les mesures ont été déterminées en utilisant une

fibre optique placée directement en contact avec les tissus. Au moins quatre spectres par tissu et par souris ont été enregistrés (au moins cinq souris ont été utilisées pour chaque condition expérimentale). Muscle, peau et 5 tumeur ont été successivement étudiés.

Le pic de fluorescence a été observé à 650 nm pour SIM01 et m-THPC. Les spectres d'émission de fluorescence de tissus de souris non traités ont été enregistrés à trois occasions 10 séparées afin d'estimer des variations intersouris. Les valeurs d'intensité de fluorescence mentionnées à la figure 6 correspondent pour chaque organe au résultat de la différence entre la valeur de fluorescence obtenue chez une souris traitée et la valeur de fluorescence enregistrée 15 dans le groupe de contrôle. Les résultats de mesure spectrofluorométrique *in vivo* ont été exprimés en coups par seconde (unité arbitraire).

Les résultats sont fournis à la figure 6. La molécule SIM01 20 montre des temps de rétention plus courts dans tous les tissus comparés à la molécule m-THPC. Le maximum d'incorporation pour SIM01 est noté entre 6 et 12 heures après injection alors que le maximum pour m-THPC est atteint entre 48 et 72 heures. Pour SIM01, aucun agent 25 photosensible n'a été détecté après 48 heures alors que pour le m-THPC, l'agent photosensible était encore détectable 144 heures après injection. La molécule SIM01 montre donc clairement un temps d'incorporation et un temps 30 de rétention plus courts que les agents photosensibles connus à ce jour. Ce temps de rétention plus court permet de réduire le temps d'hospitalisation des patients, de limiter les effets secondaires de tels traitements lourds chez ces derniers et d'éviter des traitements contre les radiations lumineuses puisque le médicament est éliminé 35 rapidement de l'organisme.

Cette cinétique d'incorporation plus rapide associée à une élimination plus rapide par rapport au m-THPC ou d'autres

composés, doit être reliée à la structure originale de la molécule objet de l'invention qui ne compte que deux phényles.

5 Les propriétés spécifiques des composés mentionnés ci-dessus en terme de temps de rétention et de temps d'incorporation dans les tissus à traiter peuvent permettre de supposer l'intérêt desdits composés dans d'autres applications, en particulier en tant que marqueurs pour des 10 dispositifs d'imagerie médicale, ces marqueurs étant caractérisés en ce qu'ils contiennent comme agent de marquage fluorescent au moins l'un des composés précités.

Les composés précités pourront encore être retenus dans le 15 cadre d'application à la fabrication de photopile, au moins l'une des couches constitutives de la photopile étant un composé du type précité.

Bien évidemment, comme il a été mentionné ci-dessus, une 20 composition incorporant de tels composés pourra, dans le cas d'une application à des fins thérapeutiques ou de diagnostics, se présenter sous diverses formes, en particulier sous forme de comprimés, de pilules, de capsules, de granules et de poudres de solution, etc. 25 administrables oralement ou entéralement. Elle pourra également se présenter sous forme d'une préparation injectable pour être administrée parentéralement ou encore sous forme de suppositoires. Elle pourra encore être préparée sous forme d'une préparation topique pouvant se 30 présenter sous forme d'une crème, d'une poudre, d'un liquide ou autre applicable localement sur ladite zone à traiter.

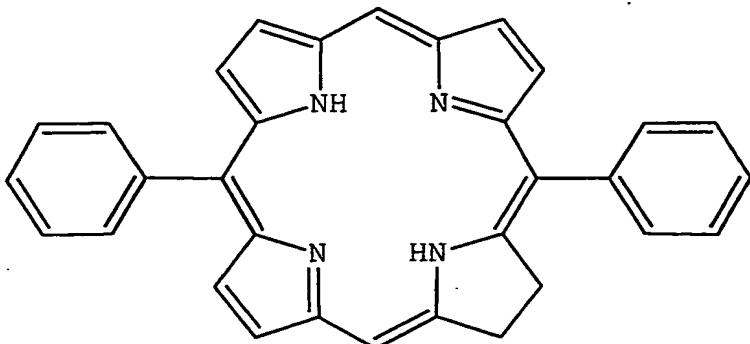
Les doses de cet agent photosensible dépendront des 35 symptômes, de l'âge et du sexe du patient et éventuellement d'autres facteurs, en particulier du type d'agent photosensible utilisé dans le cadre du traitement par photochimiothérapie et de la source de lumière utilisée.

En conclusion, ces composés, qui répondent clairement aujourd'hui aux besoins exprimés dans le domaine de la photochimiothérapie, devraient à l'avenir trouver d'autres 5 applications, notamment dans le domaine de l'imagerie médicale et celui de l'optoélectronique.

REVENDICATIONS

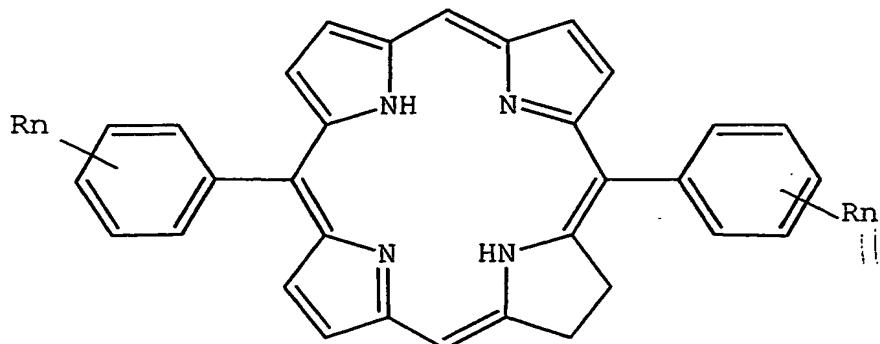
1. Composé dérivé de dihydroporphyrine répondant à la formule générale (I) :

5



dans laquelle les groupes phényles sont substitués ou non ; ou l'un de ses sels, ou l'un de ses complexes métalliques.

10 2. Composé dérivé de dihydroporphyrine selon la revendication 1 répondant à la formule générale (II) :



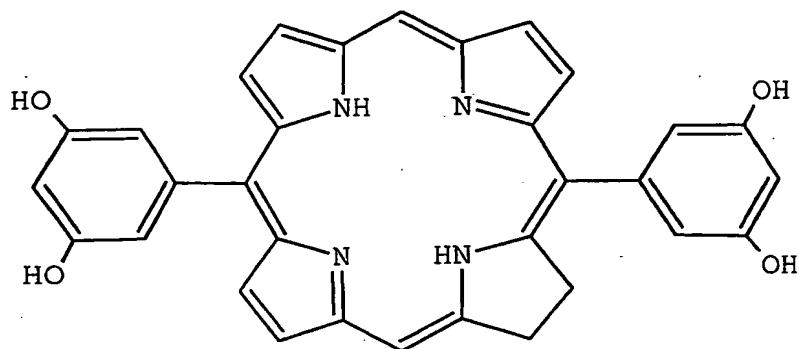
15 dans laquelle le groupe phényle est substitué, n est égale de 1 à 5, de préférence égale de 1 à 3, et chaque substituant R, qui peut être identique ou différent, et dans des positions identiques ou différentes sur son groupe phényle substitué est un groupe hydroxy (-OH), amine (-NH₂), sulphydrile (-SH), phosphonate (PO₃H₂, PO₃Na₂), éthylphosphonate (PO₃Et₂), sulfonate, aromatique, alkyl substitué ou non, cycloalkyl substitué ou non, aliphatique, acide aminé, peptide ou polypeptide, pyridine avec

20

différentes positions pour l'atome d'azote, purine, pyrimidine, nucléoside, saccharide, polysaccharide, acide carboxylique, un groupement amide, un groupement ester, un ammonium quaternaire substitué ou non.

5

3. Composé dérivé de dihydroporphyrine selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale (III):



10

4. Médicament, caractérisé en ce qu'il consiste en un composé selon l'une des revendications 1 à 3.

15

5. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient un composé selon l'une des revendications 1 à 3 associé à un excipient.

20

6. Composition utile à des fins de diagnostic ou de traitement du type comprenant au moins un agent photosensible apte à induire *in vitro* ou *in vivo* lorsqu'il est soumis à une irradiation lumineuse à une longueur d'onde déterminée, la nécrose ou la cytolysé au moins partielle d'au moins une zone cible du corps humain ou animal, caractérisée en ce que ledit agent photosensible est un composé selon l'une des revendications 1 à 3.

25

30

7. Composition selon la revendication 6,

caractérisée en ce qu'elle se présente sous une forme

21

administrable au corps humain ou animal par voie digestive ou parentérale, en particulier par injection intramusculaire ou intraveineuse ou par application transcutanée.

5

8. Composition selon l'une des revendications 6 et 7, caractérisée en ce qu'elle est administrée à une dose comprise dans la plage [0,1 mg/kg-20 mg/kg].

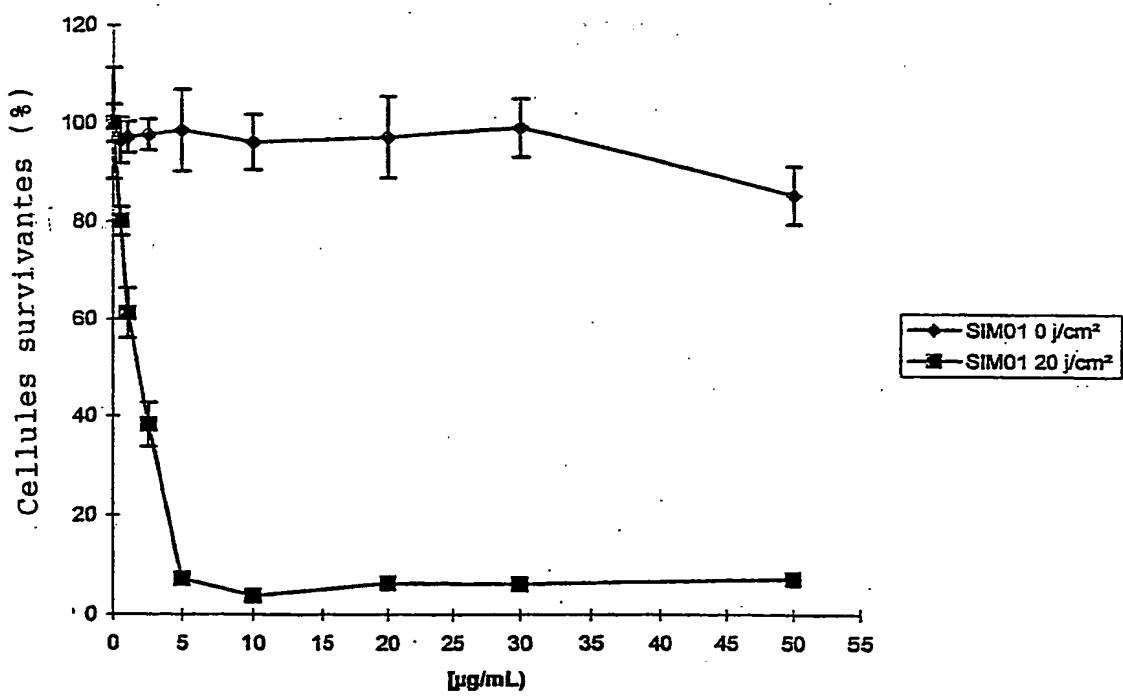
10 9. Marqueur pour dispositif d'imagerie médicale, caractérisé en ce qu'il contient comme agent de marquage fluorescent au moins un composé conforme à l'une des revendications 1 à 3.

15 10. Photopile, caractérisée en ce qu'au moins l'une des couches constitutives de la photopile est un composé selon l'une des revendications 1 à 3.

20 11. Utilisation des composés selon l'une des revendications 1 à 3 pour la fabrication d'une composition photosensible administrable à un être vivant et utile comme agent apte à engendrer, sous l'effet d'une irradiation lumineuse, une cytolysé ou une nécrose au moins partielle d'au moins une 25 zone cible du corps humain ou animal.

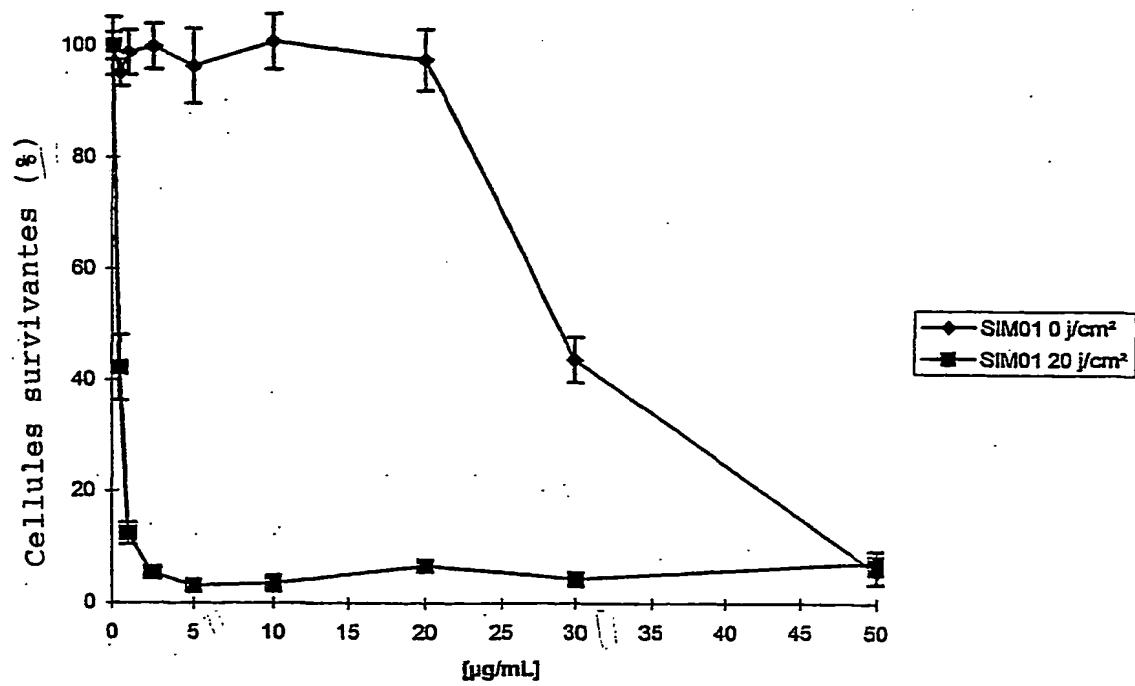
1/6

FIGURE 1



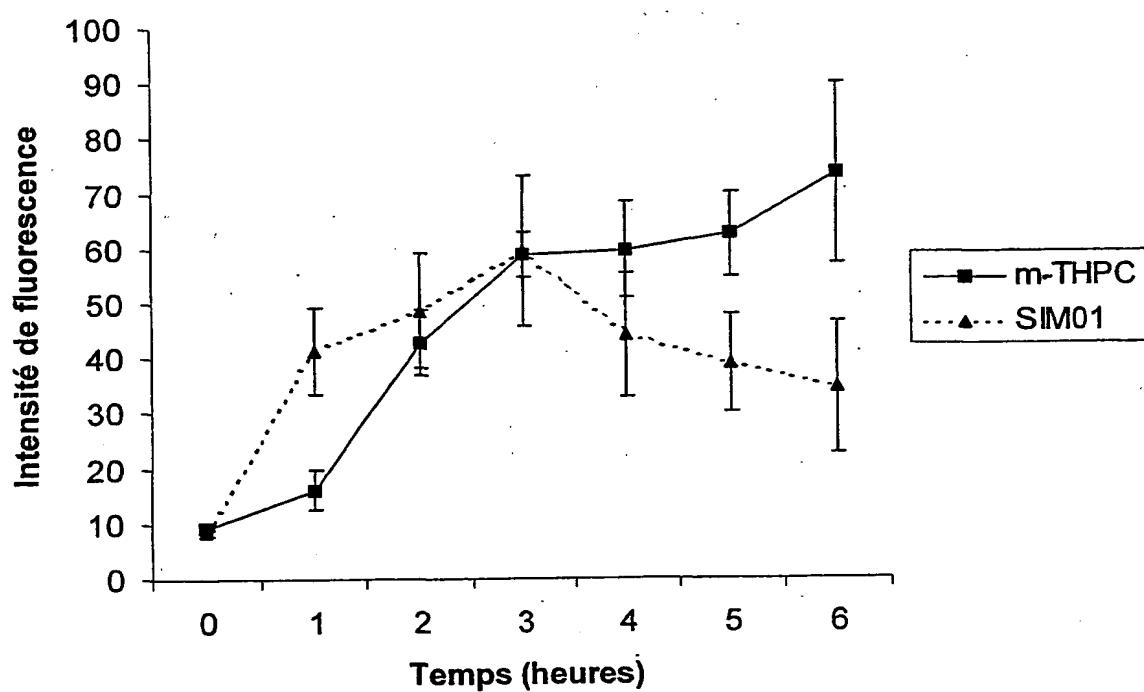
2/6

FIGURE 2



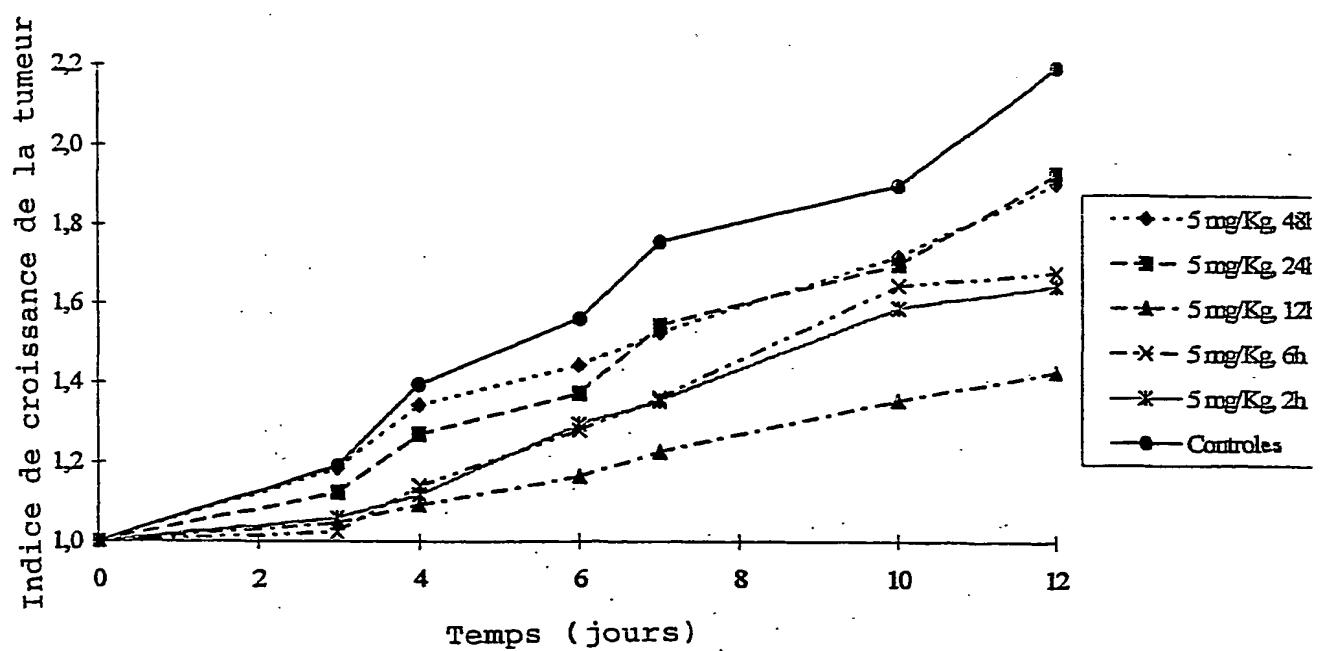
3/6

FIGURE 3



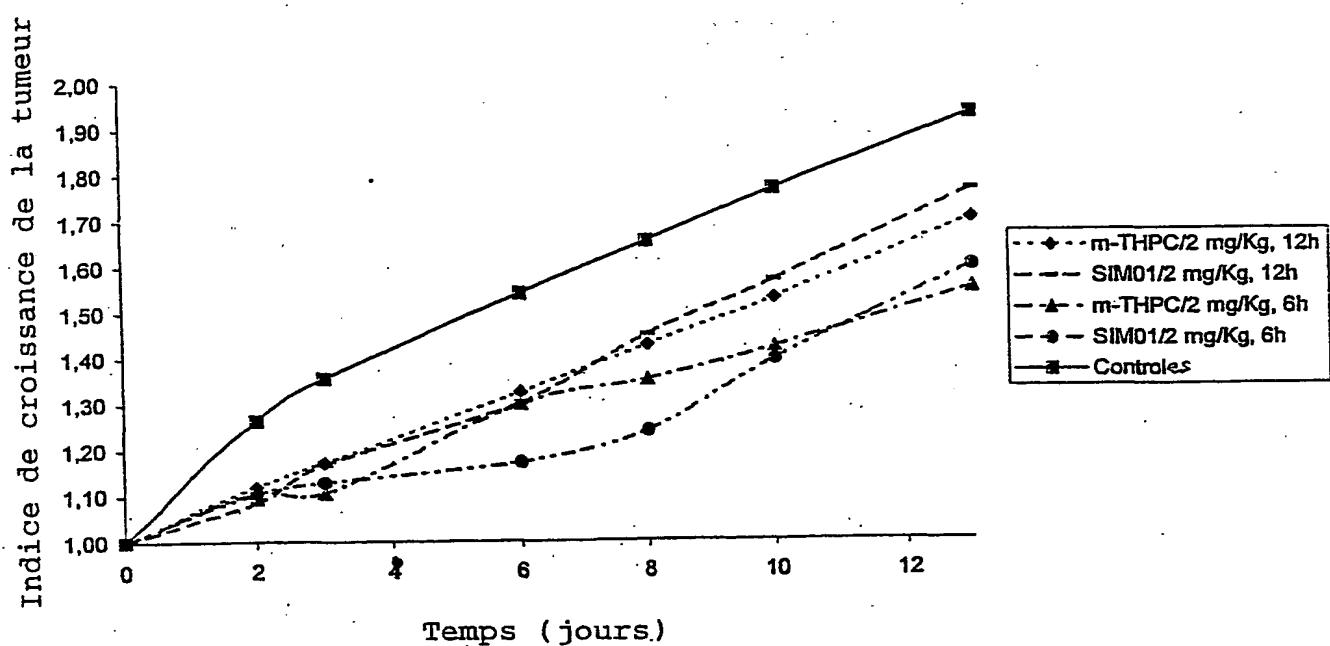
4/6

FIGURE 4



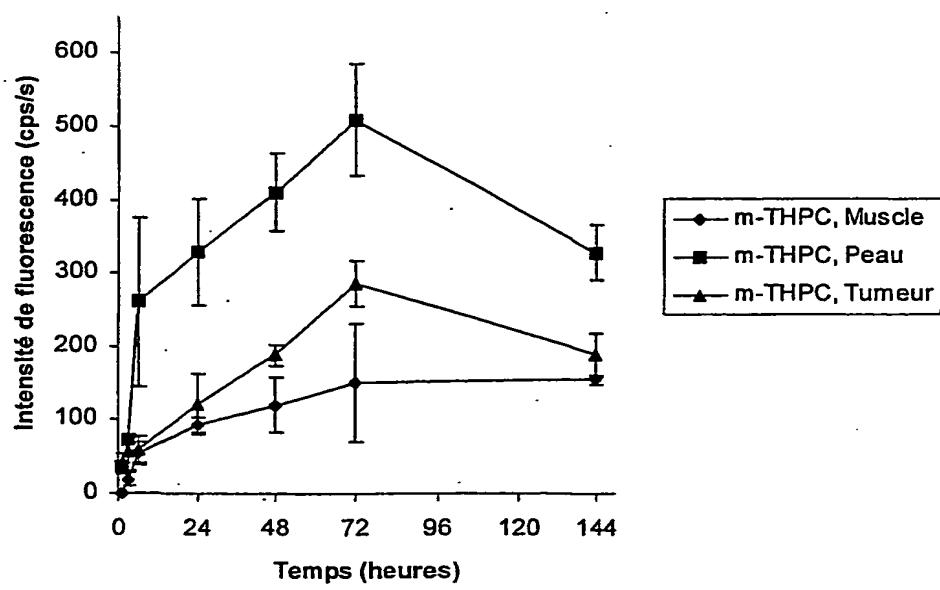
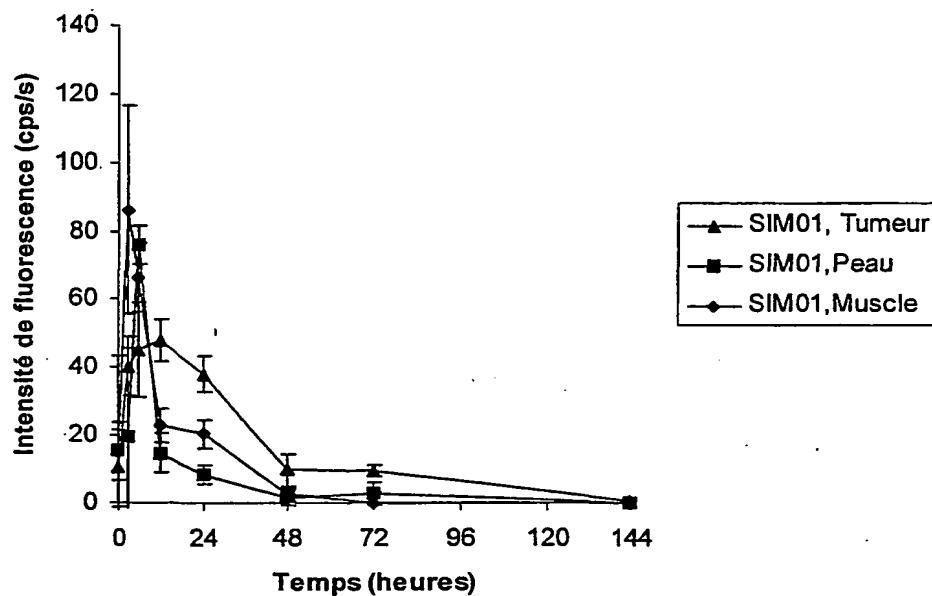
5/6

FIGURE 5



6/6

FIGURE 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No
PCT/FR 01/02470

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C07D487/22 A61K31/409 A61P35/00 A61K49/00
 //((C07D487/22,257:00,20:00,209:00,209:00,209:00))

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 C07D A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MEHTA, GOVERDHAN ET AL: "Cholate-interspersed porphyrin-anthraquinone conjugates: Photonuclease activity of large sized, 'tweezer-like' molecules" J. CHEM. SOC., PERKIN TRANS. 1 (1999), (15), 2177-2181, XP002164715 colonne 1, formule 1	1,6

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 23 November 2001	Date of mailing of the international search report 04/12/2001
---	--

Name and mailing address of the ISA
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Alfaro Faus, I

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

e Internationale No

PCT/FR 01/02470

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 7 C07D487/22 A61K31/409 A61P35/00 A61K49/00
 //((C07D487/22,257:00,20:00,209:00,209:00,209:00))

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
 CIB 7 C07D A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

CHEM ABS Data, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MEHTA, GOVERDHAN ET AL: "Cholate-interspersed porphyrin-anthraquinone conjugates: Photonuclease activity of large sized, 'tweezer-like' molecules" J. CHEM. SOC., PERKIN TRANS. 1 (1999), (15), 2177-2181, XP002164715 colonne 1, formule 1 -----	1, 6

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais clé pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 novembre 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/12/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Alfaro Faus, I